

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 000596woMege	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/02161	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 11/03/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 12/03/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G01N33/50		
Anmelder EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.</p> <p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p>		

Datum der Einreichung des Antrags 17/08/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 06.03.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Hoesel, H Tel. Nr. +49 89 2399 8693



THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONALER VORLAUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/02161

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-17 \ ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-14 mit Telefax vom 19/02/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/4-4/4 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/02161

- Beschreibung, Seiten:
 Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).
siehe Beiblatt

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1 - 14 Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1 - 14 Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1 - 14 Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: Toh H.C. et al, LEUKEMIA AND LYMPHOMA vol. 31, 1998, p. 195-208
D2: Kravtsov, V.D. ET AL, BLOOD vol. 92, 1998, p. 968-980,

PUNKT V:

1. D1 offenbart unter anderem eine zeitlich aufgelöste Messung von durch Zytostatika ausgelöster Apoptose anhand der Erfassung der Phosphatidylserinpräsenzation durch Annexin V und Propidiumiodidfärbung anhand von Reihentests (s. die Zusammenfassung, S. 197 "Cell culture", "Detection of Apoptosis..." S. 198 Sp. 2 und S. 202, "Flow cytometric analysis with annexin V/PI Assay system", sowie Fig. 3).

Folglich sind die unabhängigen Ansprüche 1 und 14, die eine Durchführung von Reihentests ausschließen, gegenüber D1 abgegrenzt.

Die Ansprüche 1 - 14 erfüllen somit die Erfordernisse von Art. 33(2) PCT.

2. Obwohl auf die Vorteile kinetischer Erfassungen der Apoptose für Chemosensitivitätstests gegenüber Endpunktmessungen in D2 ausdrücklich hingewiesen wird (s. S. 876, Sp. 2 - S. 877, Sp. 1, Z. 17), erhält der Fachmann keinerlei Hinweise, in welcher Hinsicht das in D1 genannte Verfahren zu modifizieren ist, um die vorliegende technische Aufgabe zu lösen (siehe jedoch Punkt VIII).

Daher wird der Gegenstand der Ansprüche 1 - 14 als erfinderisch im Sinne des Artikels 33(3) PCT erachtet.

PUNKT VII:

3. Die Abbildungen 1/4 - 4/4 genügen hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit nicht den Erfordernissen der Regel 11.2 (a) PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PUNKT VIII:

4. Anspruch 1 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, da der Gegenstand des Schutzbegehrens lediglich durch die zu lösende Aufgabe definiert ist, ohne jedoch die dafür notwendigen technischen Merkmale (siehe S. 8, Z. 16 - 24 der Beschreibung) zu nennen.

Gemäß Art 6 PCT und Regel 6.3 b) PCT sollte jeder unabhängige Anspruch klar definiert sein, und alle technischen Merkmale enthalten, die für die Definition der Erfindung und für die Lösung der Anmeldung zugrundeliegenden technischen Aufgabenstellung wesentlich sind.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 18 -

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose unter Vermeidung von Reihentests, wobei die Zellen im wesentlichen gleichzeitig mit mindestens einem Marker, dessen spezifische Bindefähigkeit an Phosphatidylserin detektierbar ist und mit der mindestens einen Substanz inkubiert werden und die Bindung zwischen Marker und Phosphatidylserin zeitlich aufgelöst detektiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Marker vor und/oder während der Inkubation der Zellen mit der mindestens einen Substanz zugesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen tierische oder humane Zellen sind, insbesondere Leukämiezellen, Zellen solider Tumore, Zellen pathologischer Organe und/oder Referenzzellen wie beispielsweise Zellen aus anderen als den pathologischen Organen oder Zellen aus gesunden Bereichen pathologischer Organe.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Referenzmessung ohne Zusatz der mindestens einen Substanz durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Substanzen pharmazeutische Wirksubstanzen, Chemotherapeutika, Umweltschadstoffe, Peptide, Nukleinsäuren oder Derivate hiervon, PNAs und/oder Nukleinsäurehybride eingesetzt werden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 19 -

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Marker Antikörper, Fab-Fragmente, single-chain Antikörper, Aptamere und/oder sonstige Proteine mit Bindungsstellen für Phosphatidylserin wie Annexine eingesetzt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Marker einen Farbstoffanteil, ein kolloidales Edelmetall, ein radioaktives Isotop und/oder Seltenerdenmetallchelate aufweist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen unterschieden werden, insbesondere durch Ko-Inkubation mit einem Marker für nekrotische Zellen, insbesondere mit einem mit Nukleinsäuren in Wechselwirkung tretenden Farbstoff, der intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass zur Detektion bildgebende Verfahren, wie Fluoreszenznachweisverfahren, insbesondere Verfahren auf Basis von konfokaler oder konventioneller Mikroskopie eingesetzt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Zahl der als apoptotisch identifizierten Zellen auf die Gesamtzahl der Zellen normiert wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion mit einer zeitlichen Auflösung von Stunden oder in größeren Zeitabständen erfolgt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass als Marker Annexin V in Gegenwart von Calcium im Konzentrationsbereich von 0.1 bis 30 mM, bevorzugt 1 bis 10 mM, verwendet wird.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Suche nach apoptotisch wirkenden Substanzen.

14. Verwendung eines Kits enthaltend mindestens ein Zytostatikum und mindestens einen Marker, dessen Wechselwirkung mit Phosphatidylserin detektierbar ist, wobei diese entweder als Trockensubstanz, in Lösung oder in Gegenwart von Matrixsubstanzen vorliegen. In einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz.

GEAENDERTE BLATT

EMDEANGSTFITT 10 FEB 11.30

AUSDRUCKS7FITT 19 FEB. 11:34

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESES**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 000596woMege	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 02161	Internationales Anmelddatum (Tag/Monat/Jahr) 11/03/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 12/03/1999
Anmelder		
EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ÜBER PHOSPHATIDYL SERIN

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 2a

- wie vom Anmelder vorgeschlagen
- weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.
- keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/02161

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TOH H C ET AL: "Vinorelbine induces apoptosis and caspase-3 (CPP32) expression in leukemia and lymphoma cells: a comparison with vincristine." LEUKEMIA AND LYMPHOMA, (1998 SEP) 31 (1-2) 195-208. XP002118801 cited in the application the whole document	14
A	KRAVTSOV, VLADIMIR D. ET AL: "Use of the microculture kinetic assay of apoptosis to determine chemosensitivities of leukemias" BLOOD (1998), 92(3), 968-980, XP002118802 cited in the application page 970, column 2 page 972, column 2, paragraph 3	1-13
X		14
A		1-13
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

15 June 2000

27/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/02161

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOERSMA, ANTONIUS W.M. ET AL: "Bax upregulation is an early event in cisplatin-induced apoptosis in human testicular germ-cell tumor cell line NT2, as quantitated by flow cytometry" CYTOMETRY (1997), 27(3), 275-282, XP002118803 cited in the application the whole document	14
A		1-13

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 14 September 2000 (14.09.00)	F. 12.09.01/12.07.01 K/caf							
Applicant's or agent's file reference 000596woMege	IMPORTANT NOTICE							
International application No. PCT/EP00/02161	International filing date (day/month/year) 11 March 2000 (11.03.00)	Priority date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)						
Applicant EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH et al								

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
EP,JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 14 September 2000 (14.09.00) under No. WO 00/54048

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

AVK	Sg	W	Da	H	PJ	ME	TW	JH	KB
06 SEP 2000									
K	F 12.11.00 mg								

PENT COOPERATION TREA

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 30 August 2000 (30.08.00)	To: MEYERS, Hans-Wilhelm Postfach 10 22 41 D-50462 Köln ALLEMAGNE
Applicant's or agent's file reference 000596woMege	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP00/02161	International filing date (day/month/year) 11 March 2000 (11.03.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 12 March 1999 (12.03.99)
Applicant EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
12 Marc 1999 (12.03.99)	199 10 955.9 ✓	DE	28 Augu 2000 (28.08.00)
30 Apri 1999 (30.04.99)	99108496.3 ✓	EP	28 Augu 2000 (28.08.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Jocelyne Rey-Millet
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

AK	SG	V	Da	H	HPJ	MET	TW	JH	KB
10. JULI 2000									
K	P 12.10.00/12.09.00 PCT								

PATENT COOPERATION TREATY

OKTS

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MEYERS, Hans-Wilhelm
 Postfach 10 22 41
 D-50462 Köln
 ALLEMAGNE

h C =

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

Date of mailing (day/month/year) 06 June 2000 (06.06.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 000596woMege	International application No. PCT/EP00/02161

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH (for all designated States except US)
 MEYER-ALMES, Franz, Josef (for US)

International filing date : 11 March 2000 (11.03.00)
 Priority date(s) claimed : 12 March 1999 (12.03.99)
 : 30 April 1999 (30.04.99)

Date of receipt of the record copy by the International Bureau : 23 May 2000 (23.05.00)

List of designated Offices :

EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
 National :JP,US

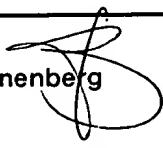
ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- time limits for entry into the national phase
- confirmation of precautionary designations
- requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  Peggy Steunenberg Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :	G01N 33/50	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/54048
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP00/02161		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. September 2000 (14.09.00)
(22) Internationales Anmeldedatum:	11. März 2000 (11.03.00)		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Prioritätsdaten:	199 10 955.9 99108496.3	12. März 1999 (12.03.99) 30. April 1999 (30.04.99)	DE EP
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>):	EVOTEC ANALYTICAL SYSTEMS GMBH [DE/DE]; Max-Planck-Straße 15a, D-40699 Erkrath (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>):	MEYER-ALMES, Franz, Josef [DE/DE]; Dürerstrasse 39, D-58636 Iserlohn (DE).		
(74) Anwälte:	MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).		

(54) Title: DETERMINATION OF THE CHEMOSENSITIVITY VIA PHOSPHATIDYL SERINE

(54) Bezeichnung: CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ÜBER PHOSPHATIDYL SERIN

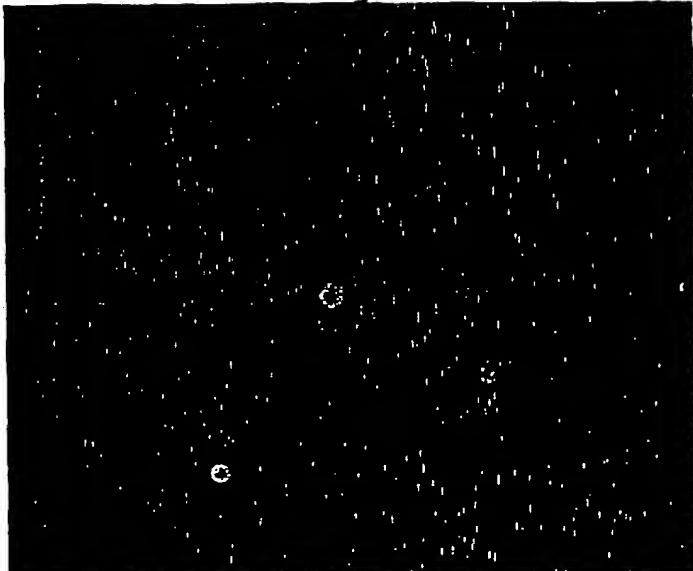
(57) Abstract

The invention relates to a method for determining the chemosensitivity of cells vis-à-vis at least one substance by measuring the level of apoptosis induced by the at least one substance. According to the inventive method, the cells are incubated substantially simultaneously with at least one marker whose interaction with phosphatidyl serine can be detected and the interaction between the marker and the phosphatidyl serine is detected after a certain period of time.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Zellen im wesentlichen gleichzeitig mit mindestens einem Marker, dessen Wechselwirkung mit Phosphatidylserin detektierbar ist, und mit der mindestens einen Substanz inkubiert werden und die Wechselwirkung zwischen Marker und Phosphatidylserin zeitlich aufgelöst detektiert wird.

+ Actinomycin D 4h



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

CHEMOSENSITIVITÄTSBESTIMMUNG ÜBER PHOSPHATIDYL SERIN

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose.

Chemosensitivitätstests

Die Behandlungs- und Heilungserfolge von Tumorerkrankungen haben seit der Einführung der Chemotherapie stark zugenommen. Beispielsweise lag die Überlebensrate bei kindlicher akuter lymphatischer Leukämie (ALL) Mitte der 60er Jahre bei weniger als 10%. Heutzutage liegt die Heilungschance bei über 70%. Die Medikamente, sog. Zytostatika, werden nach bestimmten Therapieplänen allein oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen verabreicht. Mittlerweile gibt es eine unüberschaubare Anzahl verschiedener Therapiepläne, die empirisch ermittelt und ständig weiterentwickelt werden. Das Hauptkriterium für einen verbesserten Therapieplan ist eine bessere Überlebensrate (clinical outcome). Dieses Kriterium trifft für die Mehrheit der Patienten zu. Jedes Individuum besitzt aber eine unterschiedliche Ausstattung an Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Dies trifft insbesondere auf die Eigenschaften von Tumorzellen zu. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Therapie für eine Subpopulation extrem gut wirkt, während sie für andere Patienten aufgrund von medikamentresistenten Tumoren wenig oder

- 2 -

überhaupt nicht wirksam ist. (Lacombe et al., Blood, 84, 716-723 (1994), Smit et al. International Journal of Cancer 51, 72-78 (1992)). Dabei konnte gezeigt werden, daß nicht nur die Wirksamkeit verschiedener Medikamente, sondern auch die wirksame Dosis eines Medikamentes individuell unterschiedlich sein kann. Die Ermittlung der individuellen Dosierung eines Medikamentes ist für den Patienten von Bedeutung, damit er einerseits soviel an Medikamenten bekommt, wie für seine Heilung notwendig ist, und damit andererseits die toxischen Auswirkungen der Therapie und das Risiko einer durch die Chemotherapie induzierten sekundären Krebserkrankung so gering wie möglich gehalten werden. So gut die aktuell gebräuchlichen Therapiepläne auch sind, die Fortschritte der letzten Jahre stagnieren hinsichtlich der mittleren Überlebensrate. Eine weitere deutliche Verbesserung der Chemotherapie sollte durch die Erstellung individuell angepasster Therapiepläne möglich sein.

Um diese Problematik anzugehen haben einige Forscher versucht, die individuelle Sensitivität von Patiententumoren gegenüber Zytostatika *in vitro* zu messen. Die meisten Chemosensitivitätstests, die gegenwärtig verwendet werden, basieren wenigstens teilweise auf dem von Salmon (Salmon et al. Science, 197, 461-463 (1977)) entwickelten Agar-Tumorkultur-Test. Diese Tests messen die Zellproliferation.

Ein zweiter Typ von Chemosensitivitätstests umfasst den Ausschluss von (Fluoreszenz)-Farbstoffen oder die Freisetzung des radioaktiven Chromisotops ⁵¹Cr, mit dem die Zerstörung der Zellmembran durch direkte oder indirekte Zytostatikawirkung gemessen wird. Eine Modifikation des früheren Farbstoffausschluß-Tests ist der sogenannte DiSC-Assay (Weisenthal, Kern Oncology 5: 92-103 (1991)), der durch einen zweiten Färbevorgang zusätzlich zwischen normalen und Tumorzellen differenziert.

- 3 -

Der dritte Typ von Chemosensitivitätstests bestimmt Parameter des zellulären Metabolismus als Maß für die Schädigung durch Zytostatika. Dieser Testtyp umfasst den radiometrischen BACTEC-Test (von Hoff D., Forseth B., Warfel L., in Salmon Trent(Eds.) Human tumor cloning, pp. 656-657, Grune & Stratton, Orlando (1984)), den MTT-Test (Freund A. et al. European Journal of Cancer 34:895-901 (1998), Kaspers G.J.L. Blood 92:259-266 (1998), Pieters R. et al. Leukemia 12, 1344-1348 (1998), Klumper E. et al. British Journal of Haematology 93:903-910 (1996), Hwang W.S. et al. Leukemia Research 17:685-688 (1993)) und seinen Variationen, den ATP-Test (Kangas L., Gronroos M., Nieminen A., Medical Biology 62: 338-343 (1984)) und den sogenannten FCA-Test (Meitner P., Oncology 5: 75-81, (1991), Rotman B, Teplitz C., Dickinson K., Cozzolino J., Cellular and Developmental Biology 24: f1137-1146 (1988)).

Agar-Kultur-Assays haben den großen Nachteil, dass bei weitem nicht alle Tumorzellen in den Agar-Kulturen wachsen. Dies gilt insbesondere für lymphatische Leukämien und Lymphome (Veerman A.J.P., Pieters R. British Journal of Haematology 74:381-384 (1990)). Beim bekanntesten Vertreter dieses Assay-Typs, dem Clonogenen Assay, liegt der Prozentsatz von auswertbaren Zellpopulationen nur bei 30-40%. Die Zellen müssen sehr lange (10-20 Tage) wachsen, bevor die Auswertung erfolgt. Außerdem ist der Arbeitsaufwand immens.

Die Farbstoff-Ausschluss-Tests wie auch der ⁵¹Cr-Freisetzungstest bestimmen den Anteil von Zellen mit defekter Zellmembran. Diese Tests beinhalten häufig eine Fixierung und anschließende mikroskopische Auswertung der Zellen bzw. die Messung der Radioaktivität im Überstand. Solche Tests sind aufgrund der Messung eines recht groben Parameters, der Zellmembranintegrität, unspezifisch und können nicht zwischen einer spezifischen Anti-Tumor-Wirkung einer Substanz oder einer physikalischen oder z.B. durch eine starke Verätzung oder Oxidation verursachten Zellschädigung durch eine Substanz unterscheiden. Tests dieses Typs sind folglich auch bei Substanzen positiv, die

- 4 -

generell alle Zellen schädigen und damit nicht als Antitumor-Medikament geeignet sind. Der wohl aussagekräftigste Test des Farbstoff-Ausschluß-Typs ist der DiSC-Test. Durch zweifache Anfärbung kann er im Gegensatz zu anderen Farbstoff-Ausschlusstests zwischen der Zellschädigung von Tumorzellen und normalen Zellen unterscheiden. Die Zweifach-Färbung und die anschließende mikroskopische Auswertung sind aber extrem zeitaufwendig. Außerdem variieren die Ergebnisse abhängig von der Person, die die Auswertung durchführt, und dem Bildausschnitt, der unter dem Mikroskop ausgewertet wird.

Für den radiometrische Tests wie z.B. den ^{51}Cr -Freisetzungstest gelten ganz generell: Der Einsatz von radioaktiven Isotopen in diagnostischen Tests wird heutzutage wegen des Gefährdungspotentials und der Entsorgungsproblematik zunehmend vermieden. Hinzu kommt, dass inzwischen Fluoreszenz- und Luminiszenztechniken gleiche Sensitivitäten erreichen können bei häufig kürzerer Gesamttestdauer.

Von den Chemosensitivitäts-Tests, die den Metabolismus einer Zelle als Maß für die Proliferation verwenden, wird am häufigsten der MTT-Test und seine Variationen verwendet. Der MTT-Test hat nach einer 4-tägigen Inkubation der Zellen mit diversen Zytostatika eine relativ kurze Testdauer von etwa 4 Stunden. Außerdem können 96 Proben parallel in einer Mikrotiterplatte mittels eines ELISA-Auslesegerätes ausgewertet werden. Dadurch wird ein passabler Durchsatz bei relativ geringem Personalaufwand gewährleistet. Der MTT-Test basiert auf der Umsetzung von 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in ein blaues Formazan-Produkt. Die Umsetzung wird durch Dehydrogenasen katalysiert, die nur in lebenden Zellen aktiv sind. Der MTT-Test ist abhängig von einer konstitutiven Basisaktivität der untersuchten Zellen. Es hat sich aber herausgestellt, dass einige Zelltypen, z.B. besonders häufig einige FAB-Subtypen von akuter myeloischer Leukämie, eine stark verringerte Dehydrogenaseaktivität besitzen (Santini V. et al. Hematological Oncology 7:287-293 (1989)). Die Chemosensitivität dieser Tumorzellen kann

- 5 -

daher nicht mit einem MTT-Test bewertet werden. Ein weiteres Problem sind die entstehenden wasserunlöslichen Formazankristalle. Diese müssen durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln z.B. Dimethylsulfoxid oder Isopropanol in Lösung gebracht werden. Die Erfahrung hat gezeigt, dass dadurch Probleme bei der Reproduzierbarkeit des Tests auftreten.

Apoptose

Durch Arbeiten diverser Forschergruppen (z.B. Sen, S. et al. FEBS Lett. 307:122-127, Darzynkiewicz et al. Cytometry 13: 795-808 (1992), Fulda S., Los M., Friesen C., Debatin K.M. Int. J. Cancer 76:105-114 (1998)) erscheint es wahrscheinlich, dass durch Zytostatika verursachter Zelltod generell über den Mechanismus der Apoptose verläuft. Die Apoptose stellt einen von der Zelle selbst programmierten Zelltod dar, der durch physiologische Faktoren im Organismus induziert werden kann oder durch Chemikalien wie Zytostatika ausgelöst werden kann. Der programmierte Zelltod spielt eine außerordentlich große Rolle bei der Zytostase z.B. des Immunsystems. So werden beispielsweise T-Zellen, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, durch die Apoptose aus dem Organismus entfernt. Ansonsten kann es zu Symptomen einer Autoimmunerkrankung kommen, z.B. Lupus Erythematoses, arthritische Erkrankungen oder der Erkrankung durch einen T-Zell Tumor. Substanzen wie der von Makrophagen synthetisierte Tumornekrosefaktor alpha sind natürliche Induktoren der Apoptose.

Apoptose verläuft nach einem programmierten, einheitlichen Schema, bei dem in einer sehr frühen Phase Phosphatidylserin, das sich normalerweise ausschließlich auf der Innenseite der Zellmembran befindet, auf der Außenseite präsentiert wird (Inversion). Dieses Ereignis tritt deutlich früher auf, als die Stunden später erfolgende Fragmentierung der DNA und Auflösung der Zellmembran in der späten Phase der Apoptose.

- 6 -

Neben dem Zelltod durch Apoptose existiert eine andere Form von Zelltod, die z.B. physikalisch, durch osmotischen Schock, Verätzung oder Oxidation ausgelöste Nekrose. Diese äußert sich durch stark degenerative Schäden an der Zelle.

Medenica (US 5736129) bestimmt das Ausmaß der Zellschädigung durch Zytostatika, indem er die Zellen mit Propidiumiodid anfärbt und anschließend die angefärbten Zellen im FACS (fluorescence activated cell sorter) auszählt. Dieser Ansatz hat aber den großen Nachteil, nicht genau zwischen Apoptose und Nekrose zu unterscheiden, und kann demzufolge den spezifischen Wirkmechanismus von Zytostatika nicht erfassen. Außerdem ist der Zellbedarf für eine aussagekräftige Analyse sehr hoch.

Die Erkennung von auf der Zelloberfläche präsentiertem Phosphatidylserin ist zur spezifischen Detektion von Apoptose bestens geeignet, da die Inversion von Phosphatidylserin ein sehr früher Schritt der Apoptose ist und die Anfärbung sowohl an fixierten, als auch an suspendierten Zellen schnell und leicht durchführbar ist. In bisher beschriebenen Tests wird als Phosphatidylserin bindender Marker stets Annexin V verwendet. Dieses zeichnet sich durch einen sehr niedrigen Kd von 5×10^{-10} M aus. Nachteilig ist die starke Kalzium-Kationen-Abhängigkeit der Bindung. Diese Tests bestehen alle aus einer Inkubationsphase ohne oder mit Substanzen (z.B. Zytostatika), Sedimentation und Waschen in PBS und anschließender Resuspension in Kalzium-haltigen Färbebuffer mit markiertem Annexin V. Die angefärbten Zellen können anschließend im FACS oder unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt werden. Da alle bisherigen Testprotokolle Waschschrifte enthalten und daher zu den heterogenen Assays zählen, sind diese Tests relativ arbeitsaufwendig und fehleranfällig. Diese Tests sind alle dadurch gekennzeichnet, dass die Apoptose zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Induktion durch Substanzen gemessen wird, was einer Endpunktmessung entspricht. Da die Apoptose ein dynamischer Prozess ist, der ein Maximum durchläuft, das sowohl von der untersuchten Substanz, als auch vom Zelltyp

- 7 -

abhängt, und dann in einer sekundären Nekrose ausläuft, ist a priori nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt das Ausmaß der Apoptose gemessen werden muss. Daraus folgt, dass im Prinzip für jeden Patienten mehrere Proben mit z.B. Tumorzellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten hinsichtlich der Chemosensitivität bestimmt werden müssen.

Diese Verfahrensweise ergibt sich auch aus einem Katalog der Firma Clontech aus dem Jahr 1998/99, Seite 71 bis 74 in Verbindung mit dem authentischen Durchführungsprotokoll APO Alert ®Annexin V.

TOH, H.C. et.al. beschreiben in Leukemia and Lymphoma, (1998) 31 (1-2) S. 195 - 208 eine Methode zum Nachweis der Apoptose durch Bindung von Annexin V an Lymphoma- und T-Cell-Leukemiezellen. Die Apoptose wird durch Vinorelbine und Vincristine ausgelöst. Dabei wird auch eine Endpunktmeßung durchgeführt.

Kravtsow, V.D. et.al. beschreiben in Blood (1998), 92 (3), S. 968 - 980 die Bestimmung einer Apoptosekurve durch zeitabhängige Messung der optischen Dichte einer Probe. Dabei wird kein Marker verwendet. Diese Methode erfasst einen Parameter, der indirekt mit Apoptose assoziiert ist und darüber hinaus vergleichsweise unspezifisch und störungsanfällig ist.

Boersma, A. W.M. et.al. beschreiben in Cytometry (1997), 27 (3), 275 - 282 ebenfalls eine Endpunktmeßung, bei der zu verschiedenen Zeiten Apoptose Induktoren enthaltende Inkubationen abgebrochen werden und das Ausmaß der Apoptose in den jeweiligen Ansätzen bestimmt wird.

Die bisher beschriebenen Phosphatidylserin-Tests ermöglichten keine unmittelbare Messung des zeitlichen Verlaufs der Apoptose. Mit den bisherigen Testvorschriften mußte für eine bestimmte Kombination aus einem Zelltyp und

einer Konzentration einer Substanz eine Serie von Experimenten durchgeführt werden, um den zeitlichen Verlauf der Apoptose zu erfassen. Der Zeit- und Personalaufwand, wie auch der Zellmaterialbedarf für einen derartigen Test wäre derart hoch, dass eine hochparallele Testung von wenig Zellmaterial auf Chemosensitivität gegenüber verschiedenen Konzentrationen von vielen Substanzen unmöglich war.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, die genannten Nachteile des Standes der Technik zu überwinden.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Zellen im wesentlichen gleichzeitig mit mindestens einem Marker, dessen Wechselwirkung mit Phosphatidylserin detektierbar ist und mit der mindestens einen Substanz inkubiert werden und die Wechselwirkung zwischen Marker und Phosphatidylserin zeitlich aufgelöst detektiert wird.

Die hinsichtlich ihrer Chemosensitivität zu untersuchenden Zellen werden in Gegenwart der Substanzen, d.h. gleichzeitig oder mit vorgelegten Markermolekülen, inkubiert. Dadurch wird aus den bisher eingesetzten heterogenen Testprotokollen ein homogener Test "Mix and Measure", der die unmittelbare Messung der Kinetik des apoptotischen Vorganges ermöglicht. Wenn Annexin V als Marker eingesetzt wird, muss sichergestellt werden, dass die Kalziumionenkonzentration während der gesamten Meßzeit konstant und in der optimalen Konzentration bleibt. Dies kann z.B. dadurch erreicht werden, indem die Kalziumionenkonzentration abgepuffert wird. Die Kalziumionen-Abhängigkeit kann gänzlich umgangen werden, wenn anstelle von Annexin V als Marker andere Annexine, Annexinderivate, Annexinmuttereine, Antikörper, Fab-Fragmente, single-chain Antikörper, Aptamere und/oder sonstige Proteine mit Bindungsstellen für Phosphatidylserin verwendet werden.

- 9 -

Um den Materialverbrauch weiter zu senken, ist eine Miniaturisierung möglich. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen in weniger als 10 µl Medium einige Tage in Kultur gehalten werden können. Durch die Senkung der Zellzahl pro Probenkammer auf ≤ 1000 pro Test werden hochparallele Analysen von Proben mit äußerst wenig Patientenzellen, wie z.B. aus Feinnadelbiopsien, ermöglicht. Der geringe Zellbedarf ermöglicht auch die Hochdurchsatztestung (High Throughput Screening /HTS) von unbekannten Substanzen auf anti-Tumorwirkung.

Wenn die Apoptose von Zellen pathologischer Gewebe über die Phophatidylserininversion getestet wird, ist es von Vorteil, als Referenz gesunde Zellen des Gewebes sowie dieselben Zellen ohne Substanzzusatz mitzutesten. Insbesondere ist es sinnvoll als Kontrolle eine permanente Zell-Linie, deren Chemosensitivität bekannt ist, mitzutesten, um die Funktionalität des Tests zu dokumentieren und Fehler bei der Testdurchführung zu erkennen.

Als Substanzen kommen z.B. folgende Substanzen in Frage:

A) Zytostatika

Abrin, Amethopterin, Acivin, Aclacinomycin A, Alanin-Mustard, Altretamin, Aminoglutethimid, Aminopterin, Amsacrin (mAMSA), div. anabolische Steroide, Anthrapyrazol, L-Asparaginase, 5-Azacytidin, Bazillus Calmette-Guerin, Bisantren, Buserelin, Busulfan, Butyryloxyethylglyoxal-dithiosemicarbazone, Camptothecin, Carbamat-ester, Carzinophyllin, CCNU, Chlorambucil, Chlorethylmethylcyclohexyl-nitrosoharnstoff, ChlorethylcyclohexylNitrosoharnstoff, Chlorodeoxyadenosin, Corticotropin, Cyproteronacetat, Chlorotrianisen, Chlorozotozin, Chromomycin-A, Cytosinarabinosid (Ara-C), BCNU, Bleomycin, Cis-Platin, Carbo-Platin, Cladribine, Cyclophosphamid, Dactinomycin, Daunomycin, Daunorubicin, Decarbacin, Doxorubicin, DTIC, Dehydroemitin, 4-Demethoxydaunorubicin, Demethyldoxorubicin, Deoxydoxorubicin, Dexamethason, Dibromodulcitol,

- 10 -

Dichloromethotrexat, Diethylstilbestrol, Bis-(2-chloropropyl)- DL-Serin, Doxifluridin, Elliptiniumacetat, 4'-Epidoxorubicin, Epirubicin, Epoetin alpha, Erythropoeitin, Esorubicin, Estradiol, Etoposid, Fluoxymesteron, Flutamid, Folsäure, Fotemustin, Ftoraful, 4-FU, Fludarabine-Phosphat, 5-FU, Floxuridin, Galactitol, Galliumnitrat, Goserelin, G-CSF, GM-CSF, Hydrea, Hexamethylmelamin (HMM), Hydrocortison, Hydroxyprogesteron, 4-Hydroperoxycyclophosphamid, ICRf 159, Idamycin, Ifosfamid, Immunglobulin IgIV, Interferon, Kobalt-Proporphyrinkomplex, Leucovorin Calcium, Leuprolid, Levadopa, Levothyroxin, Lindan, Liothyonin, Liotrix, Lomustin, Levamisole, Masoprocol, Maytansin, Menogaril, 6-Mercaptourin, Methosalen, Methylenelesteron, Methyl-lomustin, Mithracin, Mithramycin, Mitotan, Mitoxantron, Methotrexat (MTX), 6 MP, Mechlorethamin-Hydrochlorid, Medroxyprogesteron, Megestrolacetat, Melphalan, Mesna, Mitomycin-C, Nandrolon, Natriumphosphat P32, Navelbin, Neocarzinostatin, Nitrofururazon, nHuIFNa, nHuIFNb, nHuIFNp, Octreotidacetat, Ondansetron Hydrochlorid, Dinatrium-Pamidronat, Pentamethylmelamin (PMM), Pentostatin, Peptiochemio, Plicamycin, Prednimustin, Probroman, Procarbazin, Profiromycin, Paraplatin, Prednisolon, Prednison, RazoxanrIFNa-2a, Rubidazon, rIFNa-2b, rIFNb-1b, rIFNt-1b, rIL-2, rTNF, Semustin, SPG 827 (Podophyllinderivat), Spirogermanium, Streptonigrin, Somatostatin, Streptozocin, Tamoxifen, Taxol, Thio-TEPA, 6-Thioguanin, Tenoposid, Testolacton, Testosteron, 3-TGDR, rTNF, Thyroglobulin, Thyrotropin, Trilostan, Uracil-Mustard, VP-16, Vincristin (VCR), Vinblastin (VBL), Verapamil, Vindesin, Vinzelidin, Vitamin A-Säure, Vitamin A-Analoga, Zinostatin.

B) Peptide und Peptoide

C) Nukleinsäuren und -Derivate

D) Peptidnukleinsäuren (PNA's)

E) Hybride aus RNA's, DNA's, PNA's u. Derivate

- 11 -

Zur Erkennung von extrazellulärem Phosphatidylserin müssen Zellen in Gegenwart eines Markers mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert werden. Diese Marker können Antikörper, Fab-Fragmente, single-chain Antikörper, Aptamere und/oder sonstige Proteine mit Bindungsstellen für Phosphatidylserin wie Annexine eingesetzt werden. Diese Marker können einen Farbstoffanteil, kolloidales Edelmetall, ein radioaktives Isotop und/oder Seltenerdenmetallchelate aufweisen.

Die Detektion erfolgt bevorzugt mittels bildgebender Verfahren, wie Fluoreszenznachweisverfahren, insbesondere auf Basis von konfokaler oder konventioneller Mikroskopie. Die intakten fluoreszenzmarkierten Phosphatidylserin-präsentierenden Zellen werden z.B. mit einer CCD-Kamera aufgenommen und anschließend mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogramms gezählt. Zellen, die sich durch einen DNA-Farbstoff, wie z.B. Propidiumiodid anfärbten lassen, werden als nekrotisch angesehen und von der Zahl der über Phosphatidylserin fluoreszenzmarkierten Zellen abgezogen, so daß die Zahl der apoptotischen Zellen ermittelt wird. Diese wird dann in Bezug zur Gesamtzellmenge gesetzt, die durch automatische Bildauswertung im Phasenkontrast-Mikroskop ermittelt wird. Geeignet wäre aber auch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und konfokale Fluorimetrie, wobei z.B. die Konzentration der fluoreszenten Markermoleküle im Überstand und/oder auf der Zelloberfläche gemessen wird. Bei Mehrfachanfärbungen z.B. durch einen zweiten Marker oder denselben Marker mit einem anderem Fluoreszenzfarbstoff können im Überstand wie auch auf der Zelloberfläche Kreuzkorrelations- oder Zweifarbenkoinzidenzfluorimetrische Messungen durchgeführt werden. Dabei werden bei beiden Verfahren simultan zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe detektiert. Bei der Kreuzkorrelation werden die zeitabhängigen Fluoreszenzfluktuationssignale der beiden Messkanäle kreuzkorreliert. Bei der Zweifarbenkoinzidenzfluorimetrie gibt es genau dann ein positives Signal, wenn am selben Ort zeitgleich beide Fluoreszenzsignale auftreten. Durch solche Zweifarbenanalysen kann die Spezifität des Nachweises für die Phosphatidylserininvertierung noch gesteigert werden. Von

besonderem Nutzen ist die Anwendung von FIDA und PIDA wie in der WO 98/16814 und PCT/EP 98/06165 beschrieben. Dadurch kann die mehrfache Bindung von fluoresztenen Markermolekülen an apoptotische Zellen aufgrund der gesteigerten Fluoreszenzemission leicht gemessen werden. Durch den Einsatz von 2D-FIDA kann die Spezifität noch weiter gesteigert werden. Als sehr leistungsstark hat sich eine Kombination der erwähnten Fluoreszenzmesstechniken mit einer relativen Bewegung von Proben- und Messvolumen gegeneinander gezeigt. Da auf diese Weise sehr viel mehr Zellen pro Zeiteinheit beobachtet werden können, verbessert sich die Signalstatistik und damit das Signal/Rausch-Verhältnis drastisch. Insbesondere ist dann auch eine Quantifizierung der Bindung von fluoresztenen Markermolekülen an Zellen möglich.

Durch die Markierung von Phosphatidylserin werden apoptotische Zellen, aber auch Zellen mit defekten Zellmembranen angefärbt, da dann auch die Phosphatidylserine auf der Innenseite der Zellmembranen zugänglich werden. Wenn man den zeitlichen Verlauf der Apoptose verfolgt, so werden zunächst vermehrt intakte, apoptotische Zellen äußerlich angefärbt. Es schnüren sich kleinere ebenfalls angefärbte apoptotische Vesikel ab (apoptotic bodies). In der Endphase gehen apoptotische Zellen in die sekundäre Nekrose über und zerfallen. Nekrotische Zellen sind dadurch gekennzeichnet, daß die Zellmembranen in Fragmente zerfallen. Apoptose muss von Nekrose unterschieden werden, damit die Wirkung von wirksamen Zytostatika, die alle über einen Apoptosemechanismus verlaufen, spezifisch detektiert wird. Um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden, können zusätzlich Marker zum Ausschluss von Nekrosen, zusammen mit dem phosphatidylserin bindendem-Marker eingesetzt werden, beispielsweise Farbstoffe, die mit Nukleinsäuren in Wechselwirkung treten, aber intakte Zellmembranen nicht durchdringen können (z.B. Propidiumiodid , BOBOTM (Molecular Probes)).

- 13 -

Der zeitliche Verlauf der Apoptose kann so mittels der Markierung von Phosphatidylserin "Online" verfolgt werden.

Die Figuren 1 und 2 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen apoptotischer Zellen (siehe Beispiel 2).

Es ist von Bedeutung, das Ausmaß der Apoptose auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellen zu normieren. Dies kann z.B. durch Messung der Lichtabsorption, Streulicht, Leitfähigkeitsmessung oder mikroskopische Auswertung geschehen. Die Normierung ist notwendig, um das Ausmaß der Zellschädigung durch verschiedene Zytostatika vergleichen zu können.

Beispiel:

Ein stark wirkendes Zytostatikum, das das Wachstum der Zellen unmittelbar stoppt und alle Zellen in Apoptose überführt, kann aufgrund der geringen Zellzahl deutlich weniger Apoptose aufweisen, als im Falle eines schwächer wirkenden Zytostatikums, bei dem sich die Zellen zunächst noch vermehren können, um dann erst später zu einem geringen Teil in Apoptose zu gehen. Erst die Normierung berücksichtigt die Apoptose in Bezug auf die Gesamzellzahl und bewertet das stärker wirkende Zytostatikum richtig.

Die Chemosensitivitätstestung von Zellen lässt sich besonders vorteilhaft mit einem Kit durchführen. Dieser Kit beinhaltet einen Probenträger mit mehreren Probenkammern, wobei eine Probenkammer mindestens eine Substanz und einen Marker zur Phosphatidylserindetektion und gegebenenfalls einen Marker zum Ausschluss von Nekrose enthält. Bei dem Probenträger kann es sich z.B. um eine handelsübliche Mikrotiterplatte handeln. Die zu testenden Substanzen und der Marker können dabei entweder als Trockensubstanz, in Lösung oder in Gegenwart von Matrixsubstanzen wie z.B. Salzen, Puffer, Kohlenhydraten,

Carbonsäuren, Pyrimidinen, anorganischen oder organischen Nanopartikeln bis 1 µm Durchmesser vorliegen.

Beispiel 1

Material für die Durchführung des Chemosensitivitätstests:

- Sterilbank (Holten, Antares)
- Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Jena)
- CO₂-Inkubator (WTC Binder)
- Vortex Mixer (Bender + Hobein AG)
- Kühlschrank (2-10°C) (Bosch)
- Gefrierschrank (-20°C) (Liebherr)
- Autoklav (H+P Labortechnik GmbH)
- Zentrifuge (Eppendorf)
- Pipetten (Eppendorf)
- Pipettenspitzen (ratiolab)
- Mikrotiterplatten (96 Kammern) (Falcon)
- 12,50 ml Röhrchen (Falcon, Greiner)
- RPMI 1640 Medium (Gibco)
- Patientenblut oder -knochenmark
- Annexin V-Alexa 568™ (Boehringer Mannheim)
- BOBO™ (Molecular Probes)
- Dulbecco's PBS (Gibco)

Testdurchführung:

Zellzahlbestimmung

- 15 -

10 µl einer Zellsuspension werden in eine Neubauerkammer eingefüllt. Unter einem Lichtmikroskop werden die Zellen in den 16 Kleinstquadranten gezählt. Durch Multiplikation der Zellzahl mit 10000 erhält man die Zellzahl pro ml.

Präparationen einiger Zytostatika-Lösungen

Substanz	Lösevorschrift
Actinomycin D (Sigma A-1410)	2 mg in 100 µl Ethanol
Cis-Platin (Sigma P-4394)	1 mg in 3.3 ml vollentsalztes (VE), steriles Wasser
Doxorubicin (Sigma D-1515)	1 mg in 1 ml steriles VE Wasser
Methotrexat (Sigma M-9929)	1 mg in 1 ml DMSO + 1 ml steriles VE Wasser
Cytosinarabinosid (Sigma C-1768)	1 mg in 1 ml steriles VE Wasser
Mitoxantron (Sigma M-6546)	2 mg in 1 ml VE Wasser
Daunorubicin (Sigma D-8809)	1 mg in 1 ml PBS
Prednisolon (Sigma P-6004)	10 mg in 1 ml DMSO gelöst

Mischen und Inkubation mit Zytostatika

Die Zellen werden gemeinsam mit 0.5 µg/ml BOBO™ und 50 µM Annexin V-Alexa 568™ in Gegenwart einer konstant 3 mM Kalziumionenkonzentration mit den Zytostatika inkubiert.

Quantifizierung im Fluoreszenzmikroskop

Im Stundentakt werden pro Probe mit dem in einer CCD-Kamera und Bildauswertungssoftware ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop zunächst die durch Annexin V rot fluoreszenzmarkierten Zellen, dann durch die durch BOBO grün markierten Zellen und abschließend die Gesamtheit der Zellen in Phasenkontrast-Modus gezählt. Die durch BOBO angefärbten nekrotischen Zellen werden von der Zahl der Annexin V-positiven Zellen abgezogen und in Bezug zur Gesamtzahl der Zellen gesetzt. Dadurch erhält man den normierten Prozentsatz apoptotischer Zellen. Mit zunehmender Inkubationsdauer steigt der Anteil apoptotischer Zellen zunächst, um nach einigen Stunden wieder abzunehmen, wenn mehr und mehr Zellen in die Endphase der Apoptose, der sekundären Nekrose, übergehen. Das maximale Ausmaß der Apoptose ist ein Maß für die Wirksamkeit eines Zytostatikum.

Beispiel 2

100000 Jurkat P40 Zellen wurden in Gegenwart von 2 mm CaCl₂ und fluoreszenzmarkiertem Annexin V mit 1 µg/ml Actinomycin D zeitgleich gemischt und über einen Zeitraum von bis zu 24 h bei 37° C in 5 % CO₂ inkubiert. Nach 4, 6, 8, 10 und 24 h wurde je ein Aliquot entnommen, auf einem Objektträger aufgebracht, fixiert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Mediumkontrolle zeigt selbst nach 24 h mit der Anfärbung von nur 1 Zelle eine sehr geringe Spontanapoptoserate. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt der Grad der Apoptose - erkennbar an der zunehmenden Zahl gefärbter Zellen im Beobachtungsfeld - zu. Nach 24 h werden schon kleinere Zellfragmente sichtbar, die auf sekundäre Nekrose hinweisen. Bei noch längerer Wartezeit und fortschreitender Zellzerstörung wären irgendwann keine fluoreszenten Zelltrümmer mehr sichtbar. Es wurde gezeigt, dass die Apoptose in einer Lösung durch Bildaufnahme nach verschiedenen Zeitpunkten zeitlich aufgelöst verfolgt werden kann. Dabei

- 17 -

wurde die Reaktionsmischung zu Beginn hergestellt und anschließend nur noch die zunehmende Apoptose mittels bildgebenden Verfahren analysiert.

Figur 1 zeigt die entsprechende Aufnahme für die Kontrolle mit Medium nach 24 h. Die Figuren 2 a - 2 e zeigen den Verlauf nach Zugabe von Actinomycin.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Zellen im wesentlichen gleichzeitig mit mindestens einem Marker, dessen Wechselwirkung mit Phosphatidylserin detektierbar ist und mit der mindestens einen Substanz inkubiert werden und die Wechselwirkung zwischen Marker und Phosphatidylserin zeitlich aufgelöst detektiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Marker vor und/oder während der Inkubation der Zellen mit der mindestens einen Substanz zugesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen tierische oder humane Zellen sind, insbesondere Leukämiezellen, Zellen solider Tumore, Zellen pathologischer Organe und/oder Referenzzellen wie beispielsweise Zellen aus anderen als den pathologischen Organen oder Zellen aus gesunden Bereichen pathologischer Organe.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Referenzmessung ohne Zusatz der mindestens einen Substanz durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Substanzen pharmazeutische Wirksubstanzen, Chemotherapeutika, Umweltschadstoffe, Peptide, Nukleinsäuren oder Derivate hiervon, PNAs und/oder Nukleinsäurehybride eingesetzt werden.

- 19 -

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Marker Antikörper, Fab-Fragmente, single-chain Antikörper, Aptamere und/oder sonstige Proteine mit Bindungsstellen für Phosphatidylserin wie Annexine eingesetzt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Marker einen Farbstoffanteil, ein kolloidales Edelmetall, ein radioaktives Isotop und/oder Seltenerdenmetallchelate aufweist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen unterschieden werden, insbesondere durch Ko-Inkubation mit einem Marker für nekrotische Zellen, insbesondere mit einem mit Nukleinsäuren in Wechselwirkung tretenden Farbstoff, der intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass zur Detektion bildgebende Verfahren, wie Fluoreszenznachweisverfahren, insbesondere Verfahren auf Basis von konfokaler oder konventioneller Mikroskopie eingesetzt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Zahl der als apoptotisch identifizierten Zellen auf die Gesamtzahl der Zellen normiert wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion mit einer zeitlichen Auflösung von Stunden oder in größeren Zeitabständen erfolgt.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass als Marker Annexin V in Gegenwart von Calcium im Konzentrationsbereich von 0.1 bis 30 mM, bevorzugt 1 bis 10 mM, verwendet wird.

- 20 -

13.Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Suche nach apoptotisch wirkenden Substanzen.

14.Kit enthaltend mindestens ein Zytostatikum und mindestens einen Marker, dessen Wechselwirkung mit Phosphatidylserin detektierbar ist, wobei diese entweder als Trockensubstanz, in Lösung oder in Gegenwart von Matrixsubstanzen vorliegen.

~~THIS PAGE BLANK (USPTO)~~

- 1 / 4 -

Medium 24h

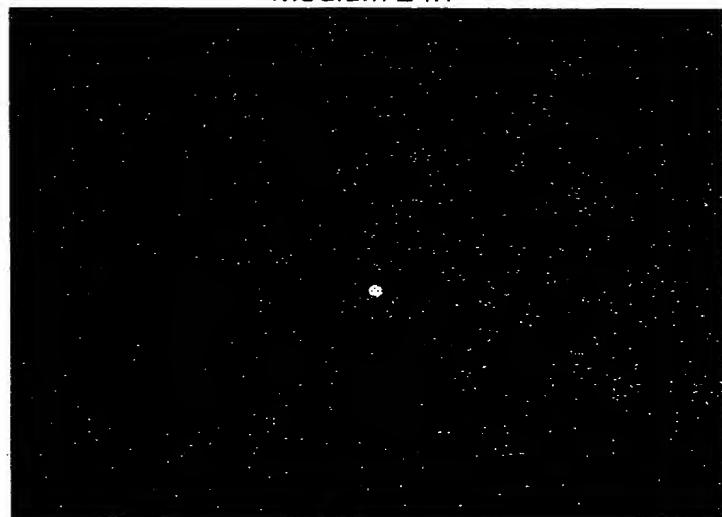


Fig. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 2 / 4 -

+ Actinomycin D 4h

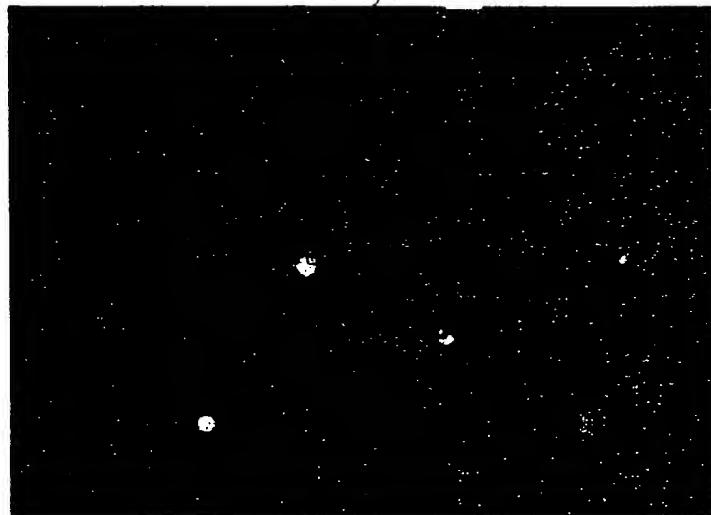


Fig. 2 a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 3 / 4 -

+ Actinomycin D 6h



Fig. 2 b

+ Actinomycin D 8h



Fig. 2 c

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 4 / 4 -

+ Actinomycin D 10h

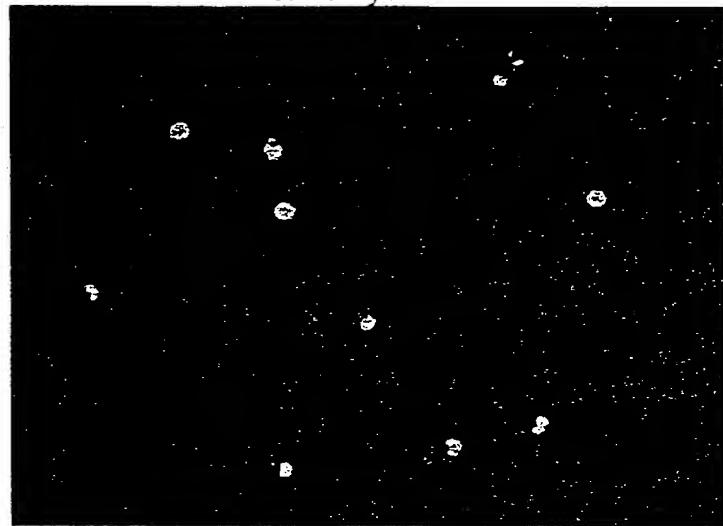


Fig. 2 d

+ Actinomycin D 24h

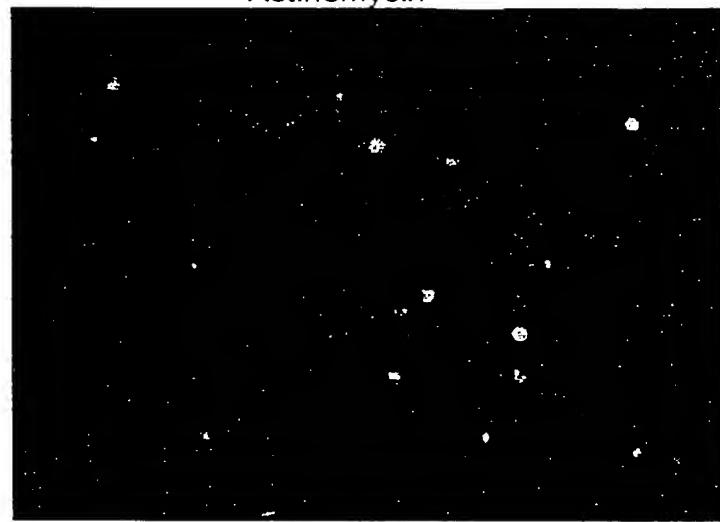


Fig. 2 e

THIS PAGE BLANK (USPTO)